



Optag af IgG i tre dage gamle minkhvalpe

Mathiesen, Ronja; Heegaard, Peter M. H.; Chriél, Mariann; Struve, Tina; Uttenthal, Åse

Published in:
Faglig Årsberetning

Publication date:
2017

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Mathiesen, R., Heegaard, P. M. H., Chriél, M., Struve, T., & Uttenthal, Å. (2017). Optag af IgG i tre dage gamle minkhvalpe. *Faglig Årsberetning*, 2017, 119-122. <https://www.kopenhagenfur.com/da/pelsdyravl/fagligt-og-forskning/faglige-aarsberetninger/>

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Sundhed

OPTAG AF IGG I TRE DAGE GAMLE MINKHVALPE

Ronja Mathiesen & Peter M.H. Heegaard, Innate Immunologi Gruppe, Afdeling for Immunologi og Vaccinologi, DTU Veterinærinstituttet, 2800 Kgs. Lyngby
Mariann Chriél, Afdeling for Diagnostik & Beredskab - Diagnostik & Udvikling, DTU Veterinærinstituttet, 2800 Kgs. Lyngby. Tina Struve, Copenhagen Fur, Langagervej 60, 2600 Glostrup. Åse Uttenthal, Vordingborg Gymnasium & HF, Chr. Richardtsvej 45, 4760 Vordingborg

Sammendrag

Minkhvalpe fødes med et meget ufærdigt immunsystem og med lave serumkoncentrationer af cirkulerende immunoglobuliner (IgG) (antistoffer). Derfor er det vigtigt at de hurtigt efter fødslen opnår høje koncentrationer af IgG i blodet ved passiv immunisering via moderens IgG i kolostrum (råmælk) og mælk. Dette er afgørende for hvalpenes modstandsdygtighed over for smitte (bakterier og virus) i deres nærmiljø. I dette studie undersøgte vi overførsel af IgG ved at tildele IgG oralt til tre dage gamle hvalpe. Overførsel af IgG til blodet blev vurderet efter tre timer. For at se et specifikt optag af mink IgG til blodcirkulationen gav vi nogle hvalpe IgG fra svin og nogle hvalpe mink IgG. De foreløbige resultater viser, at optaget ikke er specifikt for mink IgG, idet svine IgG også optages. Dog viser resultaterne, at optaget af mink IgG er procentmæssigt større end optaget af svine IgG, hvilket indikerer, at der findes en specifik Fc-receptor for mink IgG i hvalpenes tarmvæg. Fremtidige studier vil afklare hvorvidt en øget IgG serumkoncentration er korreleret med bedre beskyttelse mod "fedtede hvalpe" syndromet.

Mathiesen, R., Chriél, M., Struve, T., Uttenthal, Å. & Heegaard, P.M.H. 2018. Optag af IgG i tre dage gamle minkhvalpe. Faglig Årsberetning 2017, 119-122. København Forskning, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Danmark.

Abstract

Mink kits are born with an immature immune system and with low serum concentrations of circulating immunoglobulins (IgG) (antibodies). It is crucial that the kits reach high concentrations of IgG in the circulation after birth by passive immunization via the mother's IgG found in colostrum and milk. This is vital for the mink kits' resistance against infection (bacteria and virus) from their near environment. In this study, we investigated the transfer of IgG by giving IgG orally to three-day-old kits. The transfer of IgG to the blood circulation was evaluated after three hours. To analyze the specific uptake of mink IgG to the blood circulation some kits received porcine IgG and others mink IgG. Preliminary results indicate that IgG uptake is not specific for mink IgG, as porcine IgG is also taken up. However, the percentage of mink IgG uptake is higher than for porcine IgG, which indicates the presence of a specific Fc receptor for mink IgG located in the intestinal wall of the mink kits. Future studies will elucidate if there is a correlation between high IgG serum concentra-

tion and increased protection against "pre-weaning diarrhea" syndrome.

Mathiesen, R., Chriél, M., Struve, T., Uttenthal, Å. & Heegaard, P.M.H. 2018. Uptake of IgG in three-day-old kits. Annual Report 2017, 119-122. Copenhagen Research, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Denmark. Keywords: IgG, mink, oral overførsel, svin

Indledning

Minkhvalpe fødes med et umodent immunsystem og deres mave-tarmkanal er ikke fuldt udviklet (Hansen og El-nif, 1996). Hvalpene har endnu ikke opbygget specifik immunitet og er meget sårbare overfor belastninger såsom smitstoffer og mikroorganismer i deres nærmiljø. Minkhvalpene fødes med meget lave niveauer af cirkulerende immunoglobulin G (IgG) i blodet og må derfor supplere deres IgG via passiv immunisering fra moderens mælk (Coe and Race, 1978). Immunoglobuliner er vigtige komponenter i immunforsvaret og er med til at beskytte mod bakterier og virus i både tarm og i blodcirkulationen (Janeway *et al.*, 2001; Lipman *et al.*, 2005). Hos fritter har man påvist passiv IgG immunisering via moderens mælk efter immunisering med en influenza virus, hvorved frittehvalpen blev beskyttet mod en influenza infektion (Sweet *et al.*, 1987). Perioden i hvilken transport af IgG over tarmvæggen til blodet er mulig er hos minkhvalpe meget lang, mellem 4-5 uger (Coe and Race, 1978), hvilket er meget forskelligt fra for eksempel grise, hvor denne transport lukker efter 24 timer (Hurley and Theil, 2011). Soen kompenserer for den korte IgG transport-periode ved at have meget høje koncentrationer af IgG i kolostrum, hvorimod IgG koncentrationer i hunmink kolostrum er betydeligt lavere, svarende til den længere tid der hos minken bruges til at opbygge den ønskede koncentration af IgG i serum (>10 mg/ml) (Porter, 1965). Vi ønsker, at undersøge betydningen af effektiv transport og serumkoncentrationer af IgG hos mink for beskyttelse mod "fedtede hvalpe" syndromet, der manifesterer sig som diarre, dehydrering, øget sekretion fra apokrine kirtler i nakken og øger både morbiditeten og mortaliteten hos diende minkhvalpe før fravæning (Olesen *et al.*, 1992; Birch *et al.*, 2017). Der bruges meget antibiotika i denne periode, hvilket øger risikoen for udvikling af resistente bakterier i miljøet (Jensen *et al.*, 2016). Der er allerede nu fundet resistens hos en del patogene bakterier (f.eks. hæmolytisk *Escherichia coli* [*E. coli*]) hos mink (Nikolaissen *et al.*, 2017) og dette understreger behovet for at finde andre løsninger til behandling

af hunmink og hvalpe mod "fedtede hvalpe" syndromet. Et studie af Hedegaard *et al.* (2016) har allerede undersøgt i grise om passiv immunisering med IgG kan beskytte pattegrise mod en infektion med *E. coli* og derved undgå anvendelsen af antibiotika (Hedegaard *et al.*, 2016). Dette studie gav lovende resultater i forhold til brugen af en mulig passiv immunisering med IgG som beskyttelse mod "fedtede hvalpe" syndromet da *E. coli* også diagnosticeres i minkhvalpe med "fedtede hvalpe" syndromet (Jørgensen *et al.*, 1996; Jørgensen, 1994; Vulfson *et al.*, 2003). Formålet med denne undersøgelse er, at vurdere specifik tarmpassage af mink IgG (oprenset fra mink serum) i forhold til svine IgG hos tre dage gamle minkhvalpe over en periode på tre timer.

Materialer og metoder

Dyr

Fire hunmink (*Neovision vision*) med tre hvalpe (tre dage gamle) blev udtaget på en minkgård på Sjælland. Hunminkene og deres hvalpe var ikke vaccinerede mod mink enteritis virus (MEV).

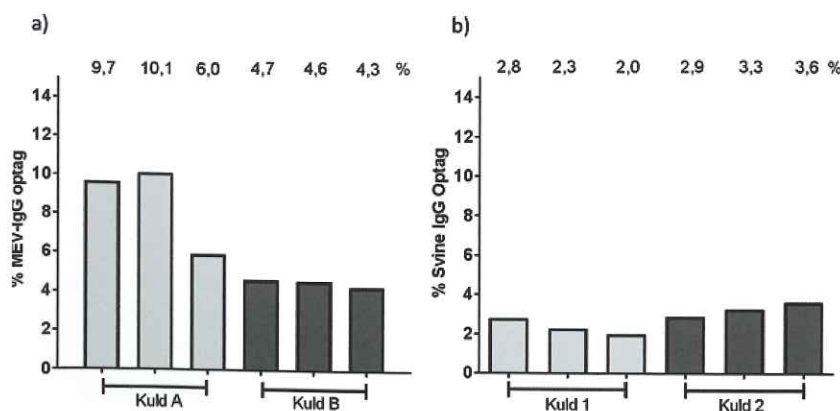
Prøveindsamling

Tre hvalpe fra hver af de fire kuld blev vejlet og lagt i varmekasse i en time. Ved hjælp af en oral gavage sprøjte modtog tre hvalpe fra kuld A og B oprenset svine IgG (oprenset som angivet i Hedegaard *et al.* (2016) og udleveret af Chris Hedegaard fra Veterinærinstituttet på Danmarks Tekniske Universitet) og tre hvalpe fra kuld 1 og 2 modtog mink enteritis virus (MEV) specifikt IgG (oprenset fra serum, se næste paragraf). MEV-IgG og svine IgG blev opblandet i en mælkeblending (9 mL sødmælk + 1 mL fløde) til 3,33 mg/mL og hvalpene fik 10 µL/gram hvalp. Efter tre timer i varmekassen blev hvalpene aflivet og ustabiliserede blodprøver blev udtaget. Efter koagulering blev blodet centrifugeret ved 4000 G i 15 minutter ved 4 °C og serum blev opsamlet som supernatant herfra og efterfølgende opbevaret ved -20 °C.

MEV-IgG oprensning

MEV-IgG blev oprenset ved udsaltning af poollet mink serum, taget fra voksne hanner og hunmink der var vaccineret mod MEV, med ammoniumsulfat og efterfølgende dialyse mod natriumacetat og phosphate buffered saline (PBS).

FIGUR 1 OPTAG AF IGG, MEV-POSITIVT MINK IGG (A) OG SVINE IGG (B), OVER TRE TIMER HOS TRE DAGE GAMLE MINKHVALPE FRA FIRE FORSKELLIGE KULD. SERUM BLEV ANALYSERET MED EN SANDWICH ELISA SPECIFIK FOR ENTEN MINK MEV-IGG ELLER SVINE IGG. OVENOVER ALLE KOLONNERNE SES PROCENTDEL I FORHOLD TIL TEORETISK FULDT OPTAG (100 %).



Analyse af overførsel af MEV-IgG og svine IgG til minkhvalpens blodcirkulation

Den procentdel af MEV-IgG og svine IgG som blev optaget af minkhvalpen blev beregnet ud fra den antagelse at en 20 gram hvalp indeholder et volumen på 1 mL blod (Tove Clausen, pers. komm.). Det vil sige, at en 20 g hvalp teoretisk skulle kunne opnå en serumkoncentration på 0,666 mg/mL ved 100 % optag.

Sandwich MEV-IgG ELISA blev modificeret fra (Uttenthal *et al.*, 1999) og bestod af fire lag; 1) kanin anti-MEV serum som catching antistof (Uttenthal, 1988), 2) virus antigen (MEV) (udleveret fra Bertel Strandbygaard, Lindholm), 3) ukendte serum prøver, 4) kanin anti hund IgG (Nordic, Netherlands) konjugeret med peroxidase som detektionsantistof. Den negative kontrol var svine IgG fra en serum prøve. Hver sandwich-ELISA indeholdt en fortyndingsrække af en standard, der bestod af MEV-IgG i en koncentration svarende til 100 % optag (udregnet som beskrevet ovenover) og de ukendte prøvers MEV-IgG koncentration blev beregnet fra standard kurven.

Sandwich-ELISA for svine IgG bestod af ged anti-svine IgG (Fc) (BIORAD/SEROTEC, AAI41) som catching antistof og det samme antistof konjugeret med biotin som binder til streptavidin konjugeret med horse radish peroxidase (DAKO, P397) der agerede som detektions antistof. Den negative kontrol var MEV-IgG fra en serum prøve og den positive kontrol var oprenset svine IgG med en koncentration svarende til 100 % optag hos minkhvalpene. Hver sandwich-ELISA indeholdt en fortyndingsrække af en standard svine IgG, (BETHYL, RS10-107), udfra hvilket de ukendte prøvers svine IgG koncentration blev beregnet.

Resultater

Optag af såvel mink MEV-IgG som svine IgG gennem tarmvæggen til blodcirkulationen hos tre dage gamle minkhvalpe er illustreret i Figur 1. Her ses det tydeligt, at både mink MEV-IgG (4,3-10,1 %, Figur 1a) og svine IgG (2,0-3,6 %, Figur 1b) overføres til blodcirkulationen. Desuden ser det ud til, at der er forskel mellem kuldene både for mink MEV-IgG og svine IgG optag: Kuld A har mellem 6,0-10,1 % optag, hvorimod kuld B har et optag mellem 4,3-4,7 % af mink MEV IgG (Figur 1a). Kuld-til-kuld forskel ses ligeledes ved svine IgG hvor kuld 1 havde et optag mellem 2,0-2,8 % og kuld 2 have et optag mellem 2,9-3,6 % (Figur 1b).

Diskussion

Oprensset MEV-positivt mink IgG fra MEV vaccinerede dyr repræsenterer en naturlig population af antistoffer med specificitet mod MEV. I minkhvalpene viste resultaterne, at mink IgG havde den højeste procentvise overførsel (4,3-10,1 %) hvis man sammenligner med svine IgG (2,0-3,6 %) – dog fordelt på forskellige kuld. Det relativt større procentvise optag af mink IgG i forhold til svine IgG hos minkhvalpe kunne indikere at optagelse af immunoglobulin fra tarmen ikke udelukkende foregår ved hjælp af en uspecifik tarmoverførsel (transcytose), men at det også afhænger af specifikke receptorer med en grad af arts-specificitet i tarmepitelet. Hos andre dyrearter, såsom rotter og mus, har man fundet en neonatal Fc receptor, som er specifik for optag af IgG (He *et al.*, 2008; Pyzik *et al.*, 2015). Også i svin er der påvist et større optag af svine IgG i forhold til makromolekyler, hvilket indikerer at også svin har en specifik receptor for IgG (Sangild *et al.*, 1999). Vores resultater viser endvidere, at der er en forskel imellem kuldene i forhold til hvor stor procentdel IgG, der blev overført, hvilket måske kan forklares med forskel i antal og/eller effektivitet af specifikke mink IgG Fc-receptorer hos hvalpene. Forskelle mellem kuldene kan eventuelt skyldes at moderens mælk er med til at "modne" tarmvæggen hos minkhvalpene – et fænomen der blandt andet er set hos svin, hvor kolostrum stimulerer lukning af tarmvæggen (Jensen *et al.*, 2001). Hos grise er det påvist, at svine IgG oprenset fra svineplasma og tildelt til pattegrise, binder stærkt til *E. coli* og derved forhindrer diarre (Hedegaard *et al.*, 2016). Dette studie bør følges op med en større undersøgelse der vurderer om høje IgG koncentrationer i blodcirkulationen hos minkhvalpe resulterer i bedre beskyttelse mod udvikling af "fedtede hvalpe" syndromet. Hvis dette påvises burde oral tilførsel af oprenset mink IgG i så fald kunne bruges som en mulig behandling i stedet for den konventionelle behandling med antibiotika.

Konklusion

Vores resultater viser, at mink IgG optages over tre timer hos tre dage gamle hvalpe og at dette optag ikke kun er uspecifikt. En mink IgG pool oprenset fra mink serum vil indeholde hele spektret af mulige antistoffer mod patogener på gården. Dette kan derved muligvis bruges til oral passiv immunisering af hvalpene, der derved opnår en bedre beskyttelse mod en eventuel infektion i deres nærmiljø. Da "fedtede hvalpe" er et multifaktorielt syndrom, vil et bredt optimeret immunforsvar med specificitet mod alle patogener (bakterier og virus) på gården være et godt alternativ til brugen af antibiotika.

Tak

En stor tak til gårdejer Klaus Juel Hansen og familie, for forsøgsdyr og uvurderlig hjælp til dette projekt. Julie Knippel Melsted Birch fra Københavns Universitet takkes for hendes hjælp ude på mink gården og Henriette Vorsholt fra Veterinærinstituttet på Danmarks Tekniske Universitet takkes for teknisk bistand. Tak til både Chris Hedegaard fra Veterinærinstituttet på Danmarks Tekniske Universitet og Bertel Strandbygaard fra Lindholm for udleveret materiale. Denne undersøgelse blev finansieret af Pelsdyrafgiftsfonden, Danmark 2016 og 2017 og forsøget blev godkendt af dyreforsøgstilsynet, tilladelsesnummer: 2016-15-0201-00906.

Referencer

- Birch, J. M., Agger, J. F., Dahlin, C., Jensen, V. F., Hammer, A. S., Struve, T., and Jensen, H. E. 2017. Risk factors associated with diarrhea in Danish commercial mink (*Neovison Vison*) during the pre-weaning period. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59: 43.
- Coe, J. E., and Race, R. E. 1978. Ontogeny of mink IgG, IgA, and IgM (40039). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 157, 289–92.
- Hansen, N. E. and Elnif, J. 1996. Mave-tarmkanalens udvikling hos minkhvalpe. I Bilag Fra Nr., Temamøde Om "Minkens Diegivningsperiode". Statens Husdyrbrugsforsøg, Intern Rapport, 2, 29–35.
- He, W., Ladinsky, M. S., Huey-Tubman, K. E., Jensen, G. J., McIntosh, J. R. and Björkman, P. J. 2008. FcRn-mediated antibody transport across epithelial cells revealed by electron tomography. *Nature*, 455, 542–46.
- Hedegaard, C. J., Strube, M. L., Hansen, M. B., Lindved, B. K., Lihme, A., Boye, M., and Heegaard, P. M. H. 2016. Natural pig plasma immunoglobulins have anti-bacterial effects: Potential for use as feed supplement for treatment of intestinal infections in pigs. *PLoS ONE*, 11, 1–14.
- Hurley, W. L., and Theil, P. K. 2011. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3, 442–74.
- Janeway, C. A. Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. 2001. The distribution and functions of immunoglobulin isotypes. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th Edition, New York: Garland.
- Jensen, A. R., Elnif, J., Burrin, D. G., Sangild, P. T. 2001. Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent. *The Journal of nutrition*, 131, 3259–65.
- Jensen, V. F., Sommer, H. M., Struve, T., Clausen, J., Chriél, M. 2016. Factors associated with usage of antimicrobials in commercial mink (*Neovison Vison*) production in Denmark. *Preventive Veterinary Medicine*, 126, 170–82.
- Jørgensen, M. 1994. *E. coli*-bakterier hyppige gæster i fedtede hvalpe [*E. coli*-bacteria frequent guests in wet kits]. *Dansk Pelsdyravsl*, 12, 546–51.
- Jørgensen, M., Scheutz, F. and Strandbygaard, B. 1996. *Escherichia Coli* and virus Isolated from 'Sticky Kits'. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 37, 163–69.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., Weis-Garcia, F. 2005. Monoclonal versus Polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 46, 258–68.
- Nikolaisen, N. K., Lassen, D. C. K., Chriél, M., Larsen, G., Jensen, V. F., Pedersen, K. 2017. Antimicrobial Resistance among Pathogenic Bacteria from mink (*Neovison Vison*) in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59:60.

Olesen, C. R, Hansen, M. and Clausen, T. N. 1992. Fedtede hvalpe-Risikofaktor og årsagssammenhænge (Sticky Kits- Risk factors and causality). Dansk Pelsdyravl, 4, 70-72.

Porter, D.D. 1965. Transfer of gamma globulin from mother to offspring in mink. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 119, 131-33.

Pyzik, M., Rath, T., Lencer, W. I., Baker, K., Blumberg, R. S. 2015. FcRn: The architect behind the immune and nonimmune functions of IgG and albumin. The Journal of immunology, 194, 4595-4603.

Sangild, P. T., Trahair, J. F., Loftager, M. K., Fowden, A. L. 1999. Intestinal macromolecule absorption in the fetal pig after infusion of colostrum in utero. The Journal of pharmacy and pharmacology, 45, 595-602.

Sweet, C., Jakeman, K. J. and Smith, H. 1987. Role of milk-derived IgG in passive maternal protection of neonatal ferrets against influenza. The Journal of general virology. 68, 2681-86.

Uttenthal, Å., Lund, E. and Hansen, M. 1999. Mink enteritis parvovirus. Stability of virus kept under outdoor conditions. APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, 107, 353-58.

Uttenthal, Å. 1988. Vaccination, apparent lack of effect of against mink enteritis virus (MEV). A challenge study. Archives of Virology 99: 153-61.

Vulfson, L., Pedersen, K., Chriel, M., Andersen, T. Holmen, Dietz, H. H. 2003. Assessment of the aerobic faecal microflora in mink (*Mustela Vison Schreiber*) with emphasis on *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Intermedius*. Veterinary Microbiology, 93, 235-45. ✕